Immucor Transplant Diagnostics, Inc.
550 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902 ; États-Unis
Tél. : +1(203) 328-9500 ou (888) 329-0255 (aux États-Unis et au Canada), Télécopie : +1 (203) 328-9599
WWW.IMMUCOR.COM

Documentation sur le produit et traductions disponibles à l'adresse : *www.Immucor.com*

ÉLÉMENT DE PRODUIT

KITS DE TYPAGE HLA SSO LIFECODES®

Destiné au diagnostic in vitro

TABLE DES MATIÈRES

Définition des symboles 1
Kits/Réactifs et numéro de référence 2
Usage prévu 3
Résumé et explication 3
Principes de la procédure 3
Réactifs 3
A. Identification 3
B. Avertissements et mises en garde 3
C. Instructions de stockage 3
D. Purification ou traitement avant emploi 3
E. Conservation et stabilité 3
Équipement requis 3
Prélèvement et préparation des échantillons 4
Protocole 4
A. Matériel fourni 4
B. Matériel, réactifs et équipement requis, mais non fournis 4
C. Matériaux supplémentaires devant être fournis par l'utilisateur 4
Mode d'emploi 4
A. Purification de l'ADN génomique 4
B. Amplification 4
C. Hybridation 5
D. Analyse avec l'appareil Luminex 6
Résultats 6
Côntrol qualité 7
Limites de la procédure 7
Causes d'erreurs 7
Valeurs attendues 8
Performances spécifiques 8
Références 8
Licences limitées 8
Informations concernant le fabricant 8
Marques commerciales utilisées 8
Annexe A 8
Électrophorèse sur gel 8
Interprétation du gel 9

DÉFINITION DES SYMBOLES **(étiquettes de produit et documents supplémentaires)**

Numéro de lot	LOT	Numéro de référence	REF	Limites de température		Limite supérieure de température	
Date d'expiration		À conserver à l'abri de la lumière		Quantité suffisante pour N tests	Σ	Ne pas congeler	
Attention – Voir le mode d'emploi		**Voir le mode d'emploi**		**Fabricant**		**Représentant européen**	EC REP

LCT-DQA Kit de typage HLA-DQA1 SSO LIFECODES, catalogue n° 628931

LM-DQA Kit de typage LIFECODES HLA-DQA à utiliser avec Luminex — produit n° 628061

Réactif		Référence du produit	Volume	Stockage	Σ 20
MX-DQA	Mélange global HLA-DQA LIFECODES	628062	420 µL	2 à 8 ºC	Quantité suffisante pour 20 échantillons
BM-DQA	Sondes nucléiques HLA-DQA LIFECODES ‡	628063	360 µL	2 à 8 ºC, **à l'abri de la lumière**	CE
DS	Solution de dilution	628155	9,9 mL	18 à 30 ºC	
TAQ	Polymérase Taq LIFECODES	628075	25 µL	-10 à -30 ºC	CE

LCT-DPB Kit de typage HLA-DPB1 SSO LIFECODES, catalogue n° 628935

LM-DPB Kit de typage HLA-DPB LIFECODES à utiliser avec Luminex — produit n° 628910

Réactif		Référence du produit	Volume	Stockage	Σ 20
MX-DPB	Mélange global HLA-DPB LIFECODES	628903	420 µL	2 à 8 ºC	Quantité suffisante pour 20 échantillons
BM-DPB	Sondes nucléiques HLA-DPB LIFECODES ‡	628902	360 µL	2 à 8 ºC, **à l'abri de la lumière**	CE
DS	Solution de dilution	628155	9,9 mL	18 à 30 ºC	
TAQ	Polymérase Taq LIFECODES	628075	25 µL	-10 à -30 ºC	CE

‡ Les sondes nucléiques sont photosensibles : les conserver si possible à l'abri de la lumière

ATTENTION : Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.

ATTENTION : *les écarts par rapport aux protocoles recommandés et aux matériaux requis, et notamment le polymérase Taq LIFECODES, n'ont pas encore été validés.*

USAGE PRÉVU

Typage des allèles HLA de classe I et de classe II sur l'ADN.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le typage HLA basé sur l'analyse de l'ADN au moyen d'ADN amplifié par PCR est une procédure couramment utilisée en laboratoire. L'amplification de l'ADN par PCR est utilisée pour augmenter le nombre de copies d'une séquence d'ADN particulière. Pour le typage HLA, des tests ultérieurs à la PCR sont utilisés pour déterminer les propriétés de l'ADN amplifié. Plusieurs types de tests, tels que la PCR-SSP (1), la SSOP directe (2), les RFLP (3) et la réverse-SSOP (4), sont utilisés pour le typage HLA. Comme pour les méthodes de SSOP et de réverse-SSOP, les kits de typage HLA-SSO LIFECODES utilisent des séquences spécifiques oligonucléotidiques ou oligosondes (SSO) pour détecter la présence des allèles HLA d'un échantillon amplifié par PCR. C'est le jeu de séquences spécifiques oligonucléotidiques utilisé - et non les méthodes - qui permet la détection de tous les allèles présents dans l'échantillon amplifié par PCR. Alors que les méthodes de réverse-SSOP et de SSOP directe emploient des marqueurs enzymatiques et des substrats colorimétriques nécessitant une étape de révélation, le test LIFECODES est un système multiplex homogène. Ceci signifie que toutes les oligosondes sont analysées simultanément et que l'intégralité du test est réalisée dans un seul tube en ajoutant un seul réactif.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

La technique de typage HLA-SSO LIFECODES consiste à hybrider un produit de PCR simple brin marqué à des oligosondes spécifiques. L'amplification d'ADN par PCR utilise généralement des quantités équimolaires d'amorces sens et anti-sens pour générer une séquence d'ADN double-brin. Toutefois, si la quantité d'une des amorces est supérieure à celle de l'autre, la réaction génère des séquences d'ADN simple-brin en plus des séquences double-brin. L'ADN double-brin est synthétisé au cours des premiers cycles de l'amplification LIFECODES. Une fois la solution d'amorce limitante épuisée, l'autre amorce utilise les séquences d'ADN double-brin produites comme matrices pour générer de l'ADN simple-brin. Cette méthode produit à la fois des séquences d'ADN double-brin et des séquences d'ADN simple-brin qui, après dénaturation, participent toutes à la réaction d'hybridation.

Chacune des différentes sondes correspond à la séquence complémentaire unique d'un allèle ou d'un groupe d'allèles. En d'autres termes, ces sondes sont définies de façon à ce que chacune d'entre elles s'hybride préférentiellement à une région complémentaire présente ou non sur la séquence d'ADN amplifiée de l'échantillon. De plus, la séquence d'ADN amplifiée est également hybridée à une ou plusieurs sondes consensus complémentaires de séquences présentes dans tous les allèles du locus. Le résultat du typage en réverse-SSOP est dépendant du type de matériel biologique et de la méthode de purification utilisés ainsi que de la quantité et de la pureté de l'ADN génomique. Le signal obtenu pour chaque sonde nucléique consensus est ainsi utilisé comme indicateur de succès des étapes d'amplification et d'hybridation. De même, le signal obtenu pour chaque sonde nucléique consensus peut également être utilisé pour standardiser celui des oligosondes spécifiques d'allèles et pour corriger les variations de quantité de produits de PCR dans la réaction d'hybridation. L'analyse des résultats obtenus par la technique de typage en réverse-SSOP peut être utilisée pour déterminer la présence ou l'absence de séquences d'ADN particulières dans l'ADN amplifié et pour identifier les allèles de l'échantillon.

La technique de typage HLA-SSO LIFECODES utilise des sondes nucléiques fixées à des microsphères Luminex conçues pour être utilisées avec l'appareil Luminex. L'appareil Luminex permet d'analyser jusqu'à 100 populations différentes de microsphères Luminex combinées du fait que chaque population se distingue de par sa fluorescence ou sa couleur unique. Une sonde oligonucléotidique spécifique peut être fixée à chaque microsphère de couleur différente. Il est donc possible de différencier les différentes sondes nucléiques d'une solution de sondes en fonction de leur fixation à une microsphère de couleur particulière. L'appareil Luminex permet également la quantification relative du produit de PCR marqué qui s'est hybridé à chaque microsphère Luminex. Comme pour les autres méthodes de SSOP, il est donc possible d'utiliser le signal relatif obtenu avec les oligosondes du test LIFECODES, pour identifier les sondes présentant une réactivité positive ou négative avec l'échantillon d'ADN amplifié (voir la section Résultats). Vous disposez alors des informations requises pour déterminer le phénotype HLA d'un échantillon.

RÉACTIFS

A. Identification

Voir les tableaux dans la section « Kits/Réactifs et numéro de référence » pour la liste complète des produits et numéros de référence.

B. Avertissements et mises en garde

1. Destiné au diagnostic in vitro.
2. Utiliser des pipettes séparées pour les manipulations pré-PCR et post-PCR.
3. Risque biologique : Tous les échantillons de sang et échantillons biologiques doivent être traités comme potentiellement dangereux. **Respecter les précautions universelles lors de la manipulation.**
4. Les solutions de dilution, les sondes nucléiques, la Taq polymérase et la streptavidine-PE contiennent des composés dangereux. Éviter tout contact avec la peau et les yeux et jeter tous les produits après usage conformément aux réglementations locales. Voir les fiches signalétiques pour plus d'informations.
5. La décision clinique touchant le traitement d'un patient ne doit pas reposer uniquement sur les seuls résultats de ces kits.

C. Instructions de stockage

1. Consulter l'étiquette d'emballage des réactifs du kit pour les températures de stockage correctes.
2. Les sondes nucléiques et la streptavidine-PE sont photosensibles. **À CONSERVER À L'ABRI DE LA LUMIÈRE. NE PAS CONGELER.**
3. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.

D. Purification ou traitement requis avant emploi

Voir la section Prélèvement et préparation.

E. Conservation et stabilité

1. Si les sels d'une solution ont précipité pendant l'envoi ou le stockage, il est nécessaire de les resolubiliser avant toute utilisation à température ambiante (18 à 30 ºC) avec un mélangeur vortex.
2. Ne pas utiliser de streptavidine conjuguée à la R-Phycoérythrine qui a été congelée pendant l'envoi ou le stockage.

ÉQUIPEMENT REQUIS

1. Appareil Luminex, PLATE-FORME LUMINEX XY (Numéro de produit 888300, 888310)
2. Les thermocycleurs suivants ont été validés : système PCR GeneAmp® 96 puits 9700 en mode 9600 (n° réf. N8050200, bloc or n° réf. 4314878). Thermocycleur Veriti™ 96 puits en mode 9700 MAX (n° réf. 4375786). Eppendorf Mastercycler® Nexus en mode SAFE (n° réf. 6333000.014). Se reporter au tableau 2 pour les vitesses de montée en température. Attention : les autres thermocycleurs et vitesses de montée en température n'ont pas été validés.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

a. L'ADN humain peut être purifié à partir de sang total, de couches leucocytaires et d'écouvillons buccaux en utilisant une méthode validée qui satisfait aux critères ci-dessous.
b. L'ADN extrait du sang conservé dans de l'EDTA et de l'ACD (acide-citrate-dextrose) a été testé et il a été démontré qu'il donne les performances attendues dans ce test. L'ADN extrait du sang conservé dans de l'héparine ne peut pas être utilisé dans ce test. D'autres conservateurs n'ont pas été testés.
c. L'ADN isolé doit être dilué dans une solution de TRIS à 10 mM, pH 8-9, ou dans de l'eau non contaminée en nucléases. Si un chélateur tel que l'EDTA est présent dans la solution, sa concentration finale ne doit pas dépasser 0,5 mM.
d. La présence d'alcool, de détergents ou de sels risque de provoquer des effets indésirables sur l'amplification d'ADN.
e. La concentration d'ADN finale doit être comprise entre 10 et 200 ng/μl.
f. Le rapport des mesures d'absorption de l'échantillon d'ADN effectuées à 260 et 280 nm doit être compris entre 1,65 et 2,0.
g. Une fois l'ADN isolé ou congelé à – 20 ºC, il est utilisable pendant une période d'un an. Éviter les congélations / décongélations successives de l'ADN au risque de le dégrader.

PROTOCOLE

Attention : les écarts par rapport aux protocoles recommandés et aux matériaux requis n'ont pas encore été validés

A. Matériel fourni (voir les tableaux dans la section « Kits/Réactifs et numéro de référence » pour des informations spécifiques)

- Mélange global approprié (MX)
- Sondes nucléiques appropriées (BM)
- Solution de dilution (DS)
- Tableau(x) de seuil(s), profil(s) des résultats des oligosondes
- Polymérase Taq LIFECODES (LIFECODES n° réf. 628075)

B. Matériel et équipement *requis*, mais non fournis

L'utilisation des matériaux suivants avec le kit a été validée :

- Liquide de gaine Luminex (1x Lifecodes, n° réf. 628005)
- Eau non contaminée en nucléases (Lifecodes, n° réf. 757003, 20 ml)
- Tubes et capuchons PCR – bandes de tubes de puits thermométrique Corning® (Costar® n° réf. 6542, LIFECODES n° réf. 888640) ou PCR Corning® à puits thermométrique équipé d'une plaque à 96 puits (n° réf. CLS6551) ou PCR thermo-scientifique AB Gene® équipé d'une super-plaque à 96 puits (n° réf. AB-2100)
- Plaque Costar® (Costar® n° réf. 6509, LIFECODES n° réf. 888630)
- Ruban transparent de puits thermométrique en polyéthylène (Costar® n° réf. 6524 (LIFECODES n° réf. 888635)
- Streptavidine R-Phycoérythrine conjuguée (SA-PE), 1mg/mL (LIFECODES n° réf. 628511)
- Kits de calibration Luminex (kit de calibration Luminex 100/200, kit de vérification de performance Luminex 100/200, LIFECODES n° réf. 628018 et 628019 respectivement)

C. Matériaux supplémentaires devant être fournis par l'utilisateur

- Agitateur-mélangeur vortex
- Matériel de compression de silicone. Axygen Scientific n° CM-FLAT ou équivalent
- Bain sonicateur
- Pointes à filtres de microcentrifugeuse
- Pipettes, pipettes multicanaux et embouts (1-20µL, 20-200µL, 1000µL)
- Logiciel de type tableur
- Bloc thermique
- Isopropanol à 70 % ou eau de Javel à 20 %
- Plateau de retenue – Applied Biosystems n° 403081 (à usage avec le thermocycleur 9700 seulement)

MODE d'EMPLOI

REMARQUES :

- Les sondes nucléiques et la streptavidine-PE sont photosensibles : **À conserver à l'abri de la lumière et ne pas congeler.**
- Préchauffer les billes à 55 - 60 ºC pendant au moins 5 à 10 minutes pour solubiliser complètement les réactifs dans la solution de sondes nucléiques.
- Soniquer brièvement (environ 15 s), puis mélanger au vortex la solution de sondes nucléiques pendant environ 15 secondes pour que les billes soient complètement en suspension.
- Faire très attention lors de l'aliquotage en utilisant des pipettes calibrées. Le non-respect de cette procédure risque d'entraîner une perte de réactifs et de fausser l'échantillon.
- Il est impératif de maintenir les températures constantes. Des variations aussi petites que +/- 0,5 °C peuvent affecter les résultats.
- Lors de l'étape d'hybridation, il est impératif que les échantillons ne restent pas dilués plus de 5 minutes à 56 °C (voir la section Résultats).
- Il est recommandé de tester les échantillons amplifiés dès que possible. Si les échantillons ne peuvent pas être testés le même jour sur l'appareil Luminex, ***le produit amplifié peut être conservé 3 jours au maximum à une température de 2 à 8 ºC. Pour une conservation prolongée, il est recommandé de le congeler à – 20 °C pendant une semaine maximum jusqu'à l'exécution du test. Le produit amplifié ne peut être congelé et décongelé qu'une seule fois. Les congélations / décongélations successives risquent de dégrader les échantillons amplifiés et d'entraîner des résultats médiocres lors du test***.

A. Purification de l'ADN génomique, en utilisant une méthode permettant d'obtenir une concentration finale comprise entre 10 et 200 ng/μl. Si nécessaire, ajouter de l'eau non contaminée en nucléases. Tous les échantillons doivent avoir la même concentration.

B. Amplification d'ADN (PCR)

1. Laisser décongeler le mélange global jusqu'à ce qu'il soit à température ambiante (18 à 30 ºC).
2. Mélanger doucement au vortex les réactifs pendant environ 10 secondes. Cela permet la dissolution des sels. Centrifuger brièvement (5 à 10 secondes) dans la microcentrifugeuse pour faire tomber le contenu au fond du tube.
3. Consulter le tableau 1 ci-dessous pour préparer les composants de la réaction d'amplification pour n+1 réactions en utilisant la quantité indiquée pour chaque réactif par réaction (à l'exception de l'ADN). Ajouter de l'eau non contaminée en nucléases pour compléter le volume à 50 μl par réaction. Mélanger doucement au vortex.
4. Pipeter la quantité appropriée d'ADN génomique **(100 à 300 ng)** dans les tubes PCR.
5. Aliquoter le mélange d'amplification dans les tubes PCR contenant l'ADN génomique. (Le volume final contenant le mélange PCR et l'ADN génomique doit être de 50 μl pour chaque réaction.)
6. Bien fermer les tubes pour éviter tout risque d'évaporation pendant la PCR.
7. Placer les échantillons dans le thermocycleur et lancer le programme, voir les **tableaux 2 et 3.**

Tableau 1. Composition de la réaction d'amplification

Réactif	Volume par échantillon
Mélange global LIFECODES	**15 µl**
ADN génomique 10 à 200 ng/µl	**Total d'environ 200 ng**
Taq polymérase	**0,5 µl (2,5 U)**
Eau non contaminée en nucléases	**Pour un volume final de 50 µl**

Tableau 2. Conditions du thermocycleur pour amplification

Thermocycleur	Mode (vitesse de montée en température)
Système PCR GenAmp® 9700	**Mode 9600 (3,5 °C/sec)**
Thermocycleur Veriti™ 96 puits	**9700 MAX mode (3,9 °C/sec)**
Eppendorf Mastercycler® Nexus	**SAFE mode, vitesse de montée en température MAX (3,0 °C/sec)**

Tableau 3. Conditions du thermocycleur pour amplification

Étape	Température et durée d'incubation	N° de cycles
1	95 ºC pour 5 min	1
2	95 ºC pour 30 sec	8
	60 ºC pour 45 sec	
	72 ºC pour 45 sec	
3	95 ºC pour 30 sec	32
	63 ºC pour 45 sec	
	72 ºC pour 45 sec	
4	72 ºC pour 15 min	1
5	4 ºC perpétuel	1

Remarque : pour vérifier l'amplification de l'échantillon, consulter Électrophorèse sur gel du produit de PCR (Annexe A).

C. Hybridation

- **Vérifier que les réactifs, tampon d'hybridation et solution de sondes nucléiques LIFECODES sont bien solubilisés et que les billes sont complètement en suspension.**
- **Allumer l'appareil Luminex et la plateforme XY pour un préchauffage d'environ 30 minutes.**

1. Préchauffer la solution de sondes nucléiques dans un bloc thermique à 55 - 60 ºC pendant au moins 5 à 10 minutes pour solubiliser complètement les réactifs dans la solution.
2. Soniquer brièvement (environ 15 s), puis mélanger au vortex la solution de sondes nucléiques pendant environ 15 secondes pour que les billes soient complètement en suspension.
3. Combiner 15 µl de la solution de sondes nucléiques à 5 µl d'un produit de PCR d'un locus spécifique dans chaque puits d'un thermocycleur équipé d'une plaque de 96 puits (Costar®, n° 6509). Lors de l'aliquotage de la solution de sondes nucléiques dans plus de 10 puits, mélanger doucement au vortex la solution de sondes nucléiques après chaque ensemble de dix. Sceller la plaque avec du ruban en polyéthylène (Costar® n° 6524).
4. Placer le tapis de compression en silicone sur le dessus de la plaque avant l'hybridation.
5. Procéder à l'hybridation des échantillons en respectant les conditions d'incubation suivantes :

Tableau 4. Conditions d'hybridation du thermocycleur

97 ºC pendant 5 minutes
47 ºC pendant 30 minutes
56 ºC pendant 10 minutes
MAINTIEN à 56 ºC

6. Pendant l'hybridation des échantillons, préparer une solution de dilution de streptavidine-PE au 200 : 1. Mélanger 170 µl de la solution de dilution (DS) et 0,85 µl de la solution de streptavidine-PE (SA-PE) (1mg/mL) par échantillon. *Il est recommandé de préparer un mélange de solution de dilution suffisant pour n+1 échantillons pour compenser la perte de volume engendrée lors du pipetage.* **(Voir le tableau 5)**
7. *Conserver le mélange de la solution de dilution / streptavidine-PE à l'abri de la lumière, à température ambiante car la streptavidine-PE est photosensible !* La solution de dilution peut être préchauffée à 45 ºC pendant 5 minutes et agitée au vortex jusqu'à dissolution complète des réactifs. La solution de dilution doit être à température ambiante (18 - 30 ºC) avant de procéder au mélange. La préparer avant toute utilisation et jeter toute solution restante.

Tableau 5. Volumes de préparation de la solution de dilution

Nb d'échantillons	Solution de dilution (DS)	Streptavidine-PE (SA-PE)
1	170 µl	0,85 µl
5	850 µl	4,25 µl
10	1700 µl	8,5 µl
20	3400 µl	17 µl
50	8500 µl	42,5 µl

Remarque : NE PAS INTERROMPRE LE PROGRAMME D'HYBRIDATION AVANT DE RETIRER LA PLAQUE DU THERMOCYCLEUR !

8. Dans la plaque maintenue à une température de 56 ºC et directement dans le thermocycleur, diluer chaque échantillon avec 170 µl du mélange de la solution de dilution / streptavidine-PE. Il est essentiel de diluer tous les échantillons dans un délai de 5 minutes (après l'étape MAINTIEN à 56 ºC de 10 minutes).
9. Retirer la plaque du thermocycleur et la placer dans l'appareil Luminex.

D. Analyse de l'échantillon avec l'appareil Luminex*

Pour de meilleurs résultats, tester immédiatement les échantillons avec l'appareil Luminex. La lecture des échantillons peut être effectuée jusqu'à 30 minutes après leur dilution. Conserver les échantillons à l'abri de la lumière en cas de lecture ultérieure.

1. Allumer l'appareil Luminex entre 30 minutes et 4 heures avant d'analyser les échantillons.
2. Avant de procéder au test des échantillons sur l'appareil Luminex, définir l'ordre d'analyse des échantillons.
   a) Sélectionner « **Create a New Batch** » (**Créer un nouveau lot**) dans le menu Fichier.
      - Par exemple, en cas d'analyse HLA-DPB, ajouter Lot pour **HLA-DPB**.
      - L'échantillon du lot est fourni et intitulé, dans ce cas, HLA-DPB.
      - Noter que les versions d'échantillon dépendent du numéro de lot et correspondent aux numéros de lot du kit.
      - Suivre les instructions successives apparaissant sur l'écran pour la création des lots.
      - **Ne pas insérer de virgule au nom attribué au lot, au risque de perdre les informations suivant cette virgule lors de l'exportation des données.**
      - Pour en savoir plus sur la création des lots et lots multiples, consulter le manuel de l'utilisateur du Luminex.
   b) Cliquer sur l'icône « **Eject** » **(Éjecter)** pour ouvrir le porte-plaque. Placer la plaque à 96 puits du thermocycleur contenant les échantillons dans le bloc thermique XYP se trouvant sur le porte-plaque.
   c) Cliquer sur l'icône Retract (Rétracter). Les échantillons sont maintenant prêts pour l'analyse. Une étape préalable doit être effectuée avant de lancer l'analyse.
   d) Une fois les échantillons analysés par l'appareil, une étape de nettoyage avec de l'isopropanol à 70 % ou à l'eau de Javel à usage domestique à 20 % doit être effectuée suivie par deux autres étapes de nettoyage. L'appareil peut désormais être éteint s'il n'est plus utilisé dans la journée.
3. Une fois la lecture terminée, les données sont exportées sous forme d'un fichier (CSV) avec les valeurs séparées par une virgule. Ces fichiers sont appelés OUTPUT.CSV et enregistrés dans un dossier sous le nom de lot saisi dans le Luminex. Ces données sont désormais disponibles pour l'attribution du typage comme décrit ci-dessous.

* Consulter le manuel de l'utilisateur du Luminex IS pour en savoir plus sur le fonctionnement de l'appareil, le démarrage quotidien, la calibration, l'entretien et les procédures d'arrêt.

RÉSULTATS

Le typage des échantillons peut être réalisé en procédant comme suit :
Les fichiers CSV créés peuvent être ouverts et les données traitées avec des programmes de tableur courants tels que Microsoft Excel, Lotus 123, Corel Quattro Pro, ou tout logiciel similaire. L'analyse comprend les étapes suivantes :

1) Vérifier que le nombre d'événements pour chaque oligosonde et dans chaque échantillon est de 60. Ces informations figurent dans la section ***Data type : count*** du fichier CSV.
2) Vérifier si les valeurs des sondes nucléiques consensus de chaque échantillon sont supérieures au minimum de leur intensité médiane de fluorescence ou IFM. Les seuils minimaux dépendent du lot et figurent dans le tableau des valeurs de Seuil au verso du certificat d'analyse.

Attention :

- *Pour obtenir des résultats fiables, l'appareil Luminex doit collecter une quantité suffisante de données.*
- *Collecter au moins 60 événements pour chaque séquence spécifique oligonucléotidique.*

3) Pour chaque sonde, soustraire sa valeur de *contrôle du bruit de fond* de la valeur de l'échantillon pour obtenir les valeurs corrigées par rapport au bruit de fond. Les valeurs de contrôle du bruit de fond figurent dans le tableau des valeurs de Seuil et dépendent du lot. Les valeurs de contrôle du bruit de fond correspondent aux valeurs IFM moyennes de chaque bille pour compenser le bruit de fond engendré par les variations de billes.
4) Pour chaque échantillon, diviser les données de bruit de fond corrigé de chaque oligosonde par la valeur de bruit de fond corrigée de la sonde nucléique consensus correspondante afin de fournir un ensemble de données normalisées.

$$\frac{\text{IFM (oligosonde)} - \text{IFM (valeur de contrôle du bruit de fond de l'oligosonde)}}{\text{IFM (consensus)} - \text{IFM (valeur de contrôle du bruit de fond de la sonde consensus)}}$$

5) Pour chaque oligosonde, enregistrer la valeur normalisée dans le tableau des valeurs de Seuil fourni au verso du certificat d'analyse.
6) Une fois toutes les valeurs calculées, le profil des résultats des oligosondes (c.-à-d., la combinaison de toutes les attributions positives et négatives) peut être comparé à celui figurant dans le ou les tableaux d'interprétation fournis.

Attention :

- *Chaque locus possède son propre tableau de valeurs seuil et pour chaque mélange de sondes.*
- ***Ces tableaux de valeurs seuil dépendent du lot. Il faut donc vérifier la concordance entre le numéro de lot des tableaux de valeurs seuil et celui du kit de typage utilisé.***

- *Si une valeur standardisée d'une sonde nucléique particulière dépasse le seuil maximal d'une attribution négative et chute en dessous de la valeur minimale d'une attribution positive, l'échantillon doit être considéré comme étant indéterminé pour cette sonde nucléique. Un typage de l'échantillon doit être effectué, en supposant que la valeur est d'abord négative puis positive.*
- *Voir la section **VALEURS ATTENDUES** pour plus d'informations sur les valeurs seuil.*

CONTRÔLE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser un contrôle négatif et un contrôle positif avec chaque test, tel qu'un blanc d'eau et un échantillon typé auparavant, respectivement. Les sondes oligonucléotides (oligosondes) spécifiques d'une séquence consensus, indiquées dans le tableau Seuil, s'hybrident aux allèles spécifiques de leur locus respectif. Les valeurs obtenues avec les oligonucléotides spécifiques d'une séquence consensus à partir des contrôles positifs doivent dépasser la valeur seuil définie pour l'oligonucléotide spécifique d'une séquence indiquée dans la feuille de travail du tableau Seuil. Les valeurs obtenues avec les oligonucléotides spécifiques d'une séquence consensus à partir des blancs d'eau doivent être en dessous de la valeur seuil définie pour l'oligonucléotide spécifique d'une séquence indiquée dans la feuille de travail du tableau Seuil.

La ou les solutions de sondes nucléiques LIFECODES contiennent une ou plusieurs sondes oligonucléotides spécifiques d'une séquence consensus identifiées dans les feuilles de travail des kits de typage. Ces sondes consensus s'hybrident à tous les allèles et servent de contrôles internes pour vérifier l'amplification et confirmer que les hybridisations ont eu lieu. Si la valeur minimale n'est pas obtenue pour ces oligosondes spécifiques d'une séquence, il est possible que l'échantillon ne fournisse pas le typage correct et l'échantillon doit faire l'objet d'un nouveau test.

Le test doit être réalisé de la manière recommandée dans la notice d'accompagnement du produit et en suivant toutes les procédures de contrôle qualité conformes aux exigences locales, régionales et nationales et/ou des organismes d'agrément.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les performances de PCR et de test décrites requièrent des conditions précises. Tout écart de ces paramètres risque d'entraîner une défaillance du produit.

Tous les appareils doivent être calibrés conformément aux recommandations du fabricant et utilisés en respectant les paramètres prescrits par le fabricant.

1) Les billes doivent être préchauffées et complètement remises en suspension avant toute utilisation. Cela permet la dissolution des composants du tampon d'hybridation.
2) Les incubations à 47 ºC et 56 ºC nécessitent un niveau de précision de la température très élevé (+/- 0,5 ºC). Il est donc essentiel d'utiliser un thermocycleur. La température doit être contrôlée au niveau des 96 puits de la plaque du thermocycleur à l'aide d'une sonde de température (BioRad, modèle VPT-0300 ou équivalent). La température interne de chaque puits et la variation entre les puits ne doivent pas fluctuer de plus de 0,5 ºC.
3) La durée d'incubation à 56 ºC est critique et ne doit pas dépasser 15 minutes. Cette durée comprend l'incubation de 10 minutes plus un maximum de 5 minutes pour diluer tous les échantillons dans le mélange de la solution de dilution / streptavidine-PE.
4) Une fois dilués, les échantillons sont stables à température ambiante pendant 2 heures maximum (à l'abri de la lumière). L'analyse d'une plaque de 96 puits par l'appareil Luminex pouvant prendre jusqu'à 1,5 heures, il est recommandé de le lancer 30 minutes au plus tard après la dilution pour s'assurer que le dernier échantillon est analysé dans la limite autorisée des deux heures.
5) Ne pas mélanger entre eux les réactifs d'autres kits ou lots.

En raison de la complexité du typage HLA, il est recommandé qu'un personnel qualifié vérifie l'interprétation des données et les attributions de typage.

CAUSES D'ERREURS

PROBLÈME	CAUSE POSSIBLE		SOLUTION
Comptage de billes insuffisant	Suspension incomplète de la solution de sondes nucléiques		Préchauffer, soniquer et mélanger au vortex la solution de sondes nucléiques et recommencer le test.
	L'instrument ne fonctionnant pas correctement	Calibration incorrecte	Calibrer l'appareil. *(Consulter le manuel de l'utilisateur du Luminex IS.)*
		Obstruction de la voie de circulation des échantillons	Retirer et soniquer l'aiguille. Effectuer un rinçage à contre-courant. Contacter Immucor Transplant Diagnostics, Inc. si le problème persiste. +32/ 3.385.47.91
Valeur de la sonde consensus inférieure au seuil	Échec d'amplification ou amplification médiocre de l'échantillon*	Quantité d'ADN insuffisante	Contrôler la concentration et la pureté de l'ADN.
		Dissolution incomplète des sels du mélange global	Chauffer le mélange global à 37 ºC pendant 5 minutes, mélanger doucement au vortex et centrifuger brièvement.
		Taq polymérase de mauvaise qualité	Utiliser une Taq polymérase LIFECODES validée n° de catalogue 628075.
	Conditions d'amplification hors des paramètres spécifiques		Effectuer un profil thermique sur le thermocycleur pour vérifier que les paramètres sont compris dans la plage spécifiée.
	Valeur de l'intensité de fluorescence médiane (IFM) faible		Préchauffer la solution de dilution à 45 ºC pendant 5 minutes avant toute utilisation et agiter au vortex. Conserver à température ambiante.
			Remplacer la streptavidine-PE.
Défaillances multiples des SSO Pas de résultat de typage HLA pour l'échantillon.	Amplification d'allèles spécifiques	Conditions d'amplification hors des paramètres spécifiques	Effectuer un profil thermique sur le thermocycleur pour vérifier que les paramètres sont compris dans la plage spécifiée.
	Contamination de l'échantillon d'ADN		Isoler de nouveau l'ADN à partir d'un échantillon de sang.
	Dégradation partielle de l'ADN		
	Évaporation pendant l'étape d'hybridation		En cas d'utilisation incomplète de la plaque, laisser une ligne libre de chaque côté des échantillons à analyser pour permettre une fermeture hermétique de la plaque.

***L'amplification par PCR peut être contrôlée par électrophorèse sur gel (voir Annexe A).**

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs peuvent généralement être définies comme positives et négatives. Dans de rares cas, les valeurs peuvent être indéterminées. Une « valeur indéterminée » représente une plage dans laquelle aucune valeur positive ou négative n'a été observée. Si un échantillon contient des valeurs indéterminées pour une sonde oligonucléotidique particulière, un typage de l'échantillon doit être effectué avec la sonde nucléique en supposant que cette dernière est d'abord négative puis positive. Trois cas sont possibles :

1. Quel que soit le choix effectué (sonde positive ou négative), l'un aboutit à une correspondance.
2. Les deux choix aboutissent à des typages.
    - L'échantillon peut être à nouveau testé, ou les allèles obtenus à partir des deux typages peuvent être rapportés.
3. Aucun des choix n'aboutit à un typage.
    - Dans ce cas, il est probable que l'attribution d'autres sondes nucléiques est incorrecte. Cet échantillon doit être à nouveau testé et réamplifié, si possible et retesté.

- Si plus de deux oligosondes sont indéterminées, l'échantillon doit être à nouveau testé.
- Si le profil des résultats des sondes nucléiques ne fournit aucun typage HLA, l'échantillon doit alors être réamplifié et à nouveau testé. Il peut également s'avérer nécessaire d'isoler de nouveau l'ADN à partir de l'échantillon et de procéder à une nouvelle amplification ou à un nouveau test.
- Comme indiqué dans la section ***Limites de la procédure***, il est essentiel de suivre exactement le protocole. Tout écart peut fausser le typage de l'échantillon.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Lorsque les kits de typage HLA-SSO LIFECODES sont utilisés selon la procédure décrite dans l'élément de produit, le type HLA de classe I et de classe II des échantillons d'ADN peut être déterminé. Les kits HLA-DPB et HLA-DQA montrent une concordance de 100 % (intervalle de confiance de 95 % : de 91,9 % à 100 %) pour 30 échantillons de compétences CAP et comparés à des résultats de compétences CAP.

RÉFÉRENCES

1. Olerup, O., et al. (1992) Tissue Antigens 39:225
2. Saiki, RK., et al. (1986) Nature 324: 163
3. Maeda, M., et al. (1989) Tissue Antigens 34: 290
4. Bugawan, TL., et al. (1990) Immunogenetics 32: 231

LICENCES LIMITÉES

Taq polymerase est fabriqué pour Immucor Transplant Diagnostics par Promega Corp. La licence de ce produit est octroyée à Promega dans le cadre des brevets U.S. N° 5,338,671 et 5,587,287 et de leurs brevets étrangers correspondants. L'achat de ce produit est soumis à une licence non transmissible limitée accordée au titulaire du brevet américain 5.981.180 ou à ses contreparties étrangères, propriétés de Luminex Corporation, s'engageant à n'effectuer que des analyses multiplex des prélèvements cliniques pour le typage HLA.

INFORMATIONS CONCERNANT LE FABRICANT :

Fabricant : Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902 ; États-Unis.
Téléphone : +1-203-328-9500, 888-329-0255, Télécopie : +1-203-328-9599

Représentant autorisé : Emergo Europe, Molenstraat 15, 2513 BH, La Haye, Pays-Bas.
Téléphone :+ (31) (0) 70 345 8570, Télécopie : +(31) (0) 70 346 7299

Service technique européen : Téléphone : +32/3 385 4791

Dernières révision et émission de ce document : Rév. 3, 2013-08-29

MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES

AB Gene®	AB Gene House	Luminex®	Luminex Corporation
Costar®	Corning Incorporated	Veriti™	Applied Biosystem
Microseal™	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Mastercycler®	Eppendorf
IDNA™ Agarose	Lonza Group, Ltd.	LIFECODES®	Immucor Inc
GelStar™	Lonza Group, Ltd.		

ANNEXE A

Électrophorèse sur gel

Les réactions de PCR effectuées avec les kits de typage HLA-SSO LIFECODES sont conçues pour générer à la fois des séquences d'ADN double brin et simple brin s'hybridant majoritairement aux oligosondes. Pour l'assurance qualité ou pour contrôler une manipulation il peut s'avérer nécessaire de faire une électrophorèse sur gel pour visualiser l'ADN amplifié dans la réaction de PCR.

Matériel requis (indiqué ci-dessous ou équivalent)

- Électrophorèse sur gel de gradient d'agarose (Lonza Group, Ltd. IDNA®, n° 50170)
- Appareil pour l'électrophorèse / alimentation
- Tampon de gel 1X (TAE 40x, Promega No. V4281)
- Marqueur d'acide nucléique sur gel GelStar® (Lonza Group, Ltd, n° 50535)
- Transilluminateur UV (ChromatoVUE, UVP Inc., modèle TM36)
- Système d'imagerie photographique

La migration relative du produit simple brin dépend de la concentration du gel et du type de tampon utilisés. Les migrations approximatives de chaque amplification sont indiquées ci-dessous pour les échantillons analysés sur un gel d'agarose à 2 % dans un tampon TAE 1X.

Conditions d'électrophorèse

1. Retirer le marqueur d'acide nucléique GelStar® (Lonza Group, Ltd, n° 50535) du congélateur et le décongeler. Le conserver à l'abri de la lumière.
2. Utiliser un gel à 2 % pour cette procédure. Pour un gel final de 200 ml, ajouter 4 grammes d'agarose dans une solution tampon TAE 1X (diluée à partir d'une solution TAE 40X). Ajouter 10 µl de marqueur d'acide nucléique GelStar® à l'agarose liquide. Lors du coulage du gel, s'assurer de conserver suffisamment d'espace pour que l'ADN puisse migrer (2,5 à 5 cm). **ATTENTION : GelStar® est un produit carcinogène à risque.**

REMARQUE : il est possible de réaliser des gels avec 20 µl d'une solution de bromure d'éthidium à 10 mg/ml au lieu d'utiliser un marqueur d'acide nucléique GelStar®. L'intensité de la bande du produit formée est moins prononcée dans les gels à base de bromure d'éthidium que dans ceux contenant le produit GelStar®. **ATTENTION : Le bromure d'éthidium est un carcinogène.**

3. Conserver le gel à l'abri de la lumière et patienter jusqu'à sa polymérisation.
4. Charger un mélange de 2.5µL de chaque produit PCR et 2.5µL 2 X tampon avec colorant visible par échantillon, par amplification de chargement. Laisser le gel migrer dans l'obscurité à environ 160 volts pendant 45 minutes ou jusqu'à ce que l'échantillon migre suffisamment loin pour apercevoir les bandes des séquences d'ADN double brin et simple brin (bande de bleu de bromophénol ou tout autre marqueur visible migrant à une distance de 2,5 à 5 cm des puits).
5. Photographier en utilisant un transilluminateur UV équipé d'un filtre photographique jaune GelStar® (Lonza Group, Ltd, n° 50536).

ATTENTION : Porter un équipement de protection lors de la manipulation d'un marqueur d'acide nucléique GelStar® ou de bromure d'éthidium et lors de la photographie avec un transilluminateur UV.

6. Analyse du gel

	HLA-DPB	HLA-DQA
Double brin (bp)	~280	~280,~240
Simple brin (bp)	~180	~180, ~160

Interprétation du gel